

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005年7月14日 (14.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/063294 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, A61P 25/28, A61K 43/00, 31/724, 31/35, 31/47, C12Q 1/00

(74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目 15-8 アミノ酸会館ビル 4 階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019628

(22) 国際出願日: 2004年12月28日 (28.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
60/532,923 2003年12月30日 (30.12.2003) US

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドブック」を参照。

(54) Title: INHIBITOR FOR THE FORMATION OF  $\gamma$ -SECRETASE COMPLEX

(54) 発明の名称:  $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤

(57) Abstract: It is intended to provide an inhibitor for the formation of a  $\gamma$ -secretase complex which comprises a cholesterol synthesis inhibitor or a protein geranylgeranylation regulator as the active ingredient; and use of a cholesterol synthesis inhibitor or a protein geranylgeranylation regulator for producing the same. It is also intended to provide a method of screening a substance having an effect of inhibiting the formation of an active complex of  $\gamma$ -secretase which comprises assaying the activity of inhibiting cholesterol synthesis or quantifying cholesterol accumulated in lipid rafts in cells. It is also intended to provide a method of screening a cholesterol synthesis inhibitor, a protein geranylgeranylation regulator or an HMG-CoA reductase inhibitor which comprises assaying the effect of inhibiting the formation of an active complex of  $\gamma$ -secretase. Moreover, it is intended to provide a method of screening an effect of a test substance on  $\gamma$ -secretase which comprises measuring the distribution of constituents (nicastrin, APH-1, Pen-2 and so on) required by  $\gamma$ -secretase for the formation of its active complex in cells.

(57) 要約: 本発明は、コレステロール合成阻害剤、又は蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤を有効成分とする  $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤、及びそれを製造するためのコレステロール合成阻害剤、又は蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤の使用を提供する。また、本発明は、コレステロールの合成阻害活性を測定すること、又は細胞の脂質ラフトにおけるコレステロールの蓄積量を測定することからなる  $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする方法に関する。また、本発明は、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定することからなるコレステロール合成阻害剤、蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤、又はHMG-CoA還元酵素阻害剤をスクリーニングする方法に関する。さらに、本発明は、細胞内における  $\gamma$ -セクレターゼが、その活性複合体を形成するに必要とされるニカストリン (nicastrin)、APH-1、Pen-2などの構成成分の細胞内における分布を測定することにより、被検物質の  $\gamma$ -セクレターゼに対する作用をスクリーニングする方法に関する。

A1

WO 2005/063294

## 明 細 書

### γ-セクレターゼ複合体形成阻害剤

#### 技術分野

[0001] 本発明は、コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤を有効成分とするγ-セクレターゼ複合体形成阻害剤又はγ-セクレターゼの活性複合体の脂質ラフト分布低下剤、及びコレステロールの合成阻害活性を測定すること、又は細胞の脂質ラフトにおけるコレステロールの蓄積量を測定することからなるγ-セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする方法又はγ-セクレターゼの脂質ラフトにおける分布を低下させる作用を有する物質をスクリーニングする方法に関する。また、本発明は、γ-セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定することからなるコレステロール合成阻害剤、蛋白グラニルグラニル化抑制剤、又はHMG-CoA還元酵素阻害剤をスクリーニングする方法に関する。さらに、本発明は、コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤を用いて、γ-セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法又はγ-セクレターゼの活性複合体の脂質ラフトにおける分布を低下させる方法に関する。また、本発明は、γ-セクレターゼ複合体形成阻害剤又はγ-セクレターゼの活性複合体の脂質ラフト分布低下剤を製造するためのコレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤の使用に関する。また、本発明は、細胞内におけるγ-セクレターゼが、その活性複合体を形成するに必要とされるニカストリン(nicastrin)、APH-1、Pen-2などの構成成分の細胞内における分布を測定することにより、被検物質のγ-セクレターゼに対する作用をスクリーニングする方法に関する。

#### 背景技術

[0002] 老人性痴呆症の代表的疾患であるアルツハイマー病(AD)は、脳の萎縮、老人斑の沈着および神経原線維の形成を特徴とする変性疾患で、神経細胞の脱落が痴呆症状を引き起こすと考えられている(N Engl J Med 2003;348:1356)。ADでは、1回膜貫通蛋白であるアミロイド前駆体タンパク質(APP)が、細胞膜に存在するα-セクレターゼよりも脂質ラフト(lipid rafts:スフィンゴ脂質とコレステロールが集積した細胞膜

のミクロドメイン)(J Clin Invest. 2002;110:597-603)に存在する $\beta$ -セクレターゼで細胞外部分が切断され、更に $\gamma$ -セクレターゼによって膜貫通部が切断されて $\text{A}\beta$ 40、 $\text{A}\beta$ 42ペプチドを生じ、これらのペプチドとりわけ凝集性の強い $\text{A}\beta$ 42が脳に沈着して神経細胞が脱落し脳の萎縮が生じる。 $\gamma$ -セクレターゼは、単一の膜貫通蛋白である $\beta$ -セクレターゼと異なり、活性サブユニットであるプレセニリン(presenilin)がニカストリン(nicastrin)、APH-1、Pen-2と $\gamma$ -セクレターゼ複合体を形成して作用し(生体の科学2003;291-296)、脂質ラフトが、 $\text{A}\beta$ 40、 $\text{A}\beta$ 42産生の場になると考えられている。セクレターゼの活性はコレステロールレベルの影響を受け、コレステロールレベルの増加は $\alpha$ -セクレターゼ活性を低下させ、 $\beta$ -セクレターゼ活性を上昇させるが、 $\gamma$ -セクレターゼの活性には大きな影響を受けないとされている(Biochem Soc Transact 2002;30:525-529)。コレステロール包接剤(J Lipid Res. 1999;40:781-96)による脂質ラフトからのコレステロールの除去では $\gamma$ -セクレターゼ活性が消失したという報告(Neurobiol Dis. 2002;9:11-23)と影響がなかったという報告(Biochemistry 2003;42:13977-86)がある。

[0003] コレステロールの生合成過程は、HMG-CoA合成酵素によりアセチル-CoAから生成された3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル-CoA(HMG-CoA)が、HMG-CoA還元酵素により還元されて、メバロン酸を生成する過程から始まる。生成されたメバロン酸は、活性イソプレン単位と呼ばれるイソペンテニルピロリン酸とされ、ゲラニルピロリン酸を経て、ファルネシルピロリン酸合成酵素によりファルネシルピロリン酸とされる。そして、スクアレン合成酵素によりスクアレンとされ、スクアレンエポキシダーゼにより2,3-エポキシスクアレンとされる。そして、ラノステロール合成酵素によりラノステロールとされてコレステロールの母体構造が形成された後、各種の修飾反応を経てコレステロールが生成される。

ファルネシルピロリン酸合成酵素により生成されたファルネシルピロリン酸の一部は、イソペンテニルピロリン酸と反応してゲラニルゲラニルピロリン酸となり、ゲラニルゲラニル転移酵素によりRhoやRacなどのタンパク質のゲラニルゲラニル化が行われる。

また、AMPKはHMG-CoA還元酵素をリン酸化して失活させてAMPK活性化剤はHMG-CoA還元酵素阻害剤と類似の作用を有している。さらに、AMPKは

アセチルCoAカルボキシラーゼをリン酸化して失活させる作用も持ち脂肪酸合成も抑制する。また、フィブラーートはAMPK活性化作用を介してHMG-CoA還元酵素抑制作用をもつことが知られている。

[0004] HMG-CoA還元酵素阻害剤は、コレステロール生合成の律速段階、HMG-CoAのメバロン酸への転換を触媒する酵素であるHMG-CoA還元酵素を拮抗阻害する薬剤であり、高コレステロール血症治療剤として知られている。HMG-CoA還元酵素阻害剤を服用している患者はAD罹患率が低いというレトロスペクティブな疫学結果が報告され(Arch Neurol 2000;57:1439-1433)、又、HMG-CoA還元酵素阻害剤はin vitro、in vivoにおけるA $\beta$ ペプチドの生成を低下させたとの結果から、HMG-CoA還元酵素阻害剤がAD治療に有用とする特許が出願されている(WO 02/062824号、WO 01/096311号、WO 01/32161号、WO 00/28981号、WO 99/48488号、USP 6,472,421号、USP 6,440,387号、USP 6,080,778号)。これらの特許明細書では、HMG-CoA還元酵素阻害剤がAPPのプロセシング即ちセクレターゼ活性の調節を介してA $\beta$ ペプチドの産生を低下させた可能性が述べられているが、 $\gamma$ -セクレターゼ活性の低下を論じたものは無い。

[0005]  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤は、本酵素がA $\beta$ 42を産生する酵素であること、活性サブユニットであるプレセニリンの遺伝子変異がAD病の原因となることなどから(Arch Neurol. 2003;60:1541-4)、AD病治療薬として、現在、盛んに検討が行われている(Adv Drug Deliv Rev. 2002;54:1579-88)。しかし、 $\gamma$ -セクレターゼはAPPの他、Notch、ErbB4、CD44、LRPなどを切断し、活性の強いものは副作用を発現する為(FASEB J 2003;17:79-81)、 $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤の開発は必ずしもうまく進んでいない。既存の薬物では、 $\gamma$ -セクレターゼ阻害作用を持つ、一部の非ステロイド性抗炎症剤がA $\beta$ 42の産生を特異的に阻害し、Notchの切断を阻害しないことが報告されている(J Biol Chem 2003;278:30748-30754, 18664-18670)。その機序についてはRho抑制の関与が示唆されている(Science 2003;302:1215-1217)。

## 発明の開示

[0006] 本発明者らは、A $\beta$ 40、A $\beta$ 42産生の場と考えられている神経細胞の脂質ラフトにおける $\gamma$ -セクレターゼ複合体の存在量を蔗糖密度勾配法により検討した結果、コレ

ステロールを除去し脂質ラフトの構造を破壊してしまうメチル  $\beta$  シクロデキストリンのようなコレステロール包接剤だけでなく、驚くべきことに、脂質ラフトのコレステロールを低下させるコレステロール合成阻害剤が、脂質ラフトのコレステロール残量に依存して脂質ラフトの  $\gamma$ -セクレターゼ複合体の存在量を低下させ、その活性を低下させることを見出し、本発明を完成した。従って、本発明は脂質ラフトへの  $\gamma$ -セクレターゼ複合体の分布量を低下させる新しいタイプの  $\gamma$ -セクレターゼ活性抑制剤及びそのスクリーニング方法を提供するものである。

また、本発明者らは、培養細胞に被検物質を添加して、細胞内における  $\gamma$ -セクレターゼが、その活性複合体を形成するに必要とされるニカストリン (nicastrin)、APH-1、Pen-2などの成分の細胞内における分布を測定することにより、被検物質の  $\gamma$ -セクレターゼに対する作用をスクリーニングできることを見出した。

[0007] 本発明は、第一に、コレステロールの合成阻害活性を測定することからなる、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする方法、より詳細には、脂質ラフトに蓄積され得るコレステロールの合成阻害活性を測定することからなる、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする方法を提供するものである。

本発明は、第二に、コレステロールの合成阻害活性を測定することからなる、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の脂質ラフトにおける分布を低下させる作用を有する物質をスクリーニングする方法、より詳細には、脂質ラフトに蓄積され得るコレステロールの合成阻害活性を測定することからなる、 $\gamma$ -セクレターゼの脂質ラフトにおける分布を低下させる作用を有する物質をスクリーニングする方法を提供するものである。

本発明は、第三に、被検物質の存在下に、細胞を培養し、細胞の脂質ラフトにおけるコレステロールの蓄積量を測定することからなる  $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする方法を提供するものである。

本発明は、第四に、被検物質の存在下に、細胞を培養し、細胞の脂質ラフトにおけるコレステロールの蓄積量を測定することからなる、 $\gamma$ -セクレターゼの脂質ラフトにおける分布を低下させる作用を有する物質をスクリーニングする方法を提供するものである。

[0008] 本発明は、第五に、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定することからなるコレステロール合成阻害剤、蛋白グラニルグラニル化抑制剤、又はHMG-CoA還元酵素阻害剤をスクリーニングする方法、より詳細には脂質ラフトにおける $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定することからなるコレステロール合成阻害剤、蛋白グラニルグラニル化抑制剤、又はHMG-CoA還元酵素阻害剤をスクリーニングする方法を提供するものである。

本発明は、第六に、 $\gamma$ -セクレターゼの脂質ラフトにおける分布を低下させる作用を測定することからなるコレステロール合成阻害剤、蛋白グラニルグラニル化抑制剤、又はHMG-CoA還元酵素阻害剤をスクリーニングする方法、より詳細には脂質ラフトにおける $\gamma$ -セクレターゼの分布を低下させる作用を測定することからなるコレステロール合成阻害剤、蛋白グラニルグラニル化抑制剤、又はHMG-CoA還元酵素阻害剤をスクリーニングする方法を提供するものである。

[0009] 本発明は、第七に、コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤を有効成分とする $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤を提供するものである。

本発明は、第八に、コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤を有効成分とする $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の脂質ラフト分布低下剤を提供するものである。

本発明は、第九に、コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤を用いて、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法を提供するものである。

本発明は、第十に、コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤を用いて、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の脂質ラフトにおける分布を低下させる方法を提供するものである。

本発明は、第十一に、 $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤を製造するためのコレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤の使用を提供するものである。

本発明は、第十二に、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の脂質ラフト分布低下剤を製造するためのコレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤の使

用を提供するものである。

さらに、本発明は、培養細胞に被検物質を添加して、細胞内における $\gamma$ -セクレターゼが、その活性複合体を形成するに必要とされるニカストリン(nicastrin)、APH-1、Pen-2などの構成成分の細胞内における分布を測定することにより、被検物質の $\gamma$ -セクレターゼに対する作用をスクリーニングする方法に関する。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]メチル $\beta$ シクロデキストリン処理後の細胞膜分画のイムノプロティングを示す。図1のAはニカストリンについてのものであり、BはPS1CTFについてのものであり、CはPS2CTFについてのものであり、DはPEN-2についてのものであり、Eはフロチリン-1についてのものである。各々のプロッティングの図は、上からメチル $\beta$ シクロデキストリンの濃度が0mM、1mM、及び2mMのものである。図中の1-10は、蔗糖密度勾配遠心法によるフラクションの番号を示す。

[0011] [図2]メチル $\beta$ シクロデキストリンによる細胞膜分画のコレステロール及びタンパク質含量の変化を示したグラフである。四角印(□及び■)はメチル $\beta$ シクロデキストリンの濃度が0mMの場合を示し、三角印(△及び▲)は1mMの場合を示し、丸印(○及び●)は2mMの場合をそれぞれ示す。白抜きの印はコレステロールの量を示し、黒抜きの印はタンパク質の量を示す。グラフの横軸はフラクションの番号を示し、左側の縦軸はコレステロールの量( $\mu$ g/mL)を示し、右側の縦軸はタンパク質の量(mg/mL)を示す。

[0012] [図3]HMG-CoA還元酵素阻害剤処理後の細胞膜分画のイムノプロティングを示す。図3のAはニカストリンについてのものであり、BはPS1CTFについてのものであり、CはPS2CTFについてのものであり、Dはフロチリン-1についてのものである。各々のプロッティングの図は、上からコントロール、コンパクチン50 $\mu$ M添加の場合、ピタバスタチン5 $\mu$ M添加の場合をそれぞれ示す。

[0013] [図4]HMG-CoA還元酵素阻害剤による細胞膜分画のコレステロール及びタンパク質含量の変化を示したグラフである。四角印(□及び■)はコントロールとしてのメバロン酸250 $\mu$ Mの場合を示し、丸印(○及び●)はコンパクチン(メバロン酸250 $\mu$ M及びコンパクチン50 $\mu$ M)の場合を示し、三角印(△及び▲)はピタバスタチン(メバロン

酸250  $\mu$  M及びピタバスタチン5  $\mu$  M)の場合をそれぞれ示す。白抜きの印はコレステロールの量を示し、黒抜きの印はタンパク質の量を示す。グラフの横軸はフラクションの番号を示し、左側の縦軸はコレステロールの量( $\mu$  g/mL)を示し、右側の縦軸はタンパク質の量(mg/mL)を示す。

### 発明の詳細な説明

[0014] 本発明者らは、後述する実施例において示されるように、細胞にHMG-CoA還元酵素阻害剤を添加することにより、脂質ラフトにおけるコレステロール含有量の顕著な減少が見られるだけでなく(図3参照)、メチル  $\beta$  シクロデキストリンを添加した場合と同様な  $\gamma$ -セクレターゼ活性複合体の構成成分であるニカストリン、プレセニリン1及びプレセニリン2が脂質ラフト分画(フラクション3)から消失する(図3A、B及びC参照)ことを見出した。HMG-CoA還元酵素阻害剤の場合には、フロティリンは脂質ラフト分画に未だ残っており脂質ラフト構造は保たれていた。

このことは、脂質ラフトのコレステロールを低下させるコレステロール合成阻害剤が、脂質ラフトのコレステロール残量に依存して脂質ラフトの  $\gamma$ -セクレターゼ活性複合体の存在量を低下させ、その活性を低下させることを明らかにしたものである。また、A  $\beta$  の產生を抑制するNSAIDsがRho抑制を介して働くと報じられていること(Science 2003;302:1215-1217)、この実験で使用したHMG-CoA還元酵素阻害剤がコレステロールの合成阻害だけでなくタンパク質のゲラニルゲラニル化をも阻害する活性を有していることから、HMG-CoA還元酵素阻害剤がRhoのゲラニルゲラニル化抑制剤として機能していることを包含するものである。

また、本発明者らは、蔗糖密度勾配法などにより細胞の構成要素をフラクション化することにより、 $\gamma$ -セクレターゼ活性複合体の構成成分であるニカストリン、プレセニリン1(PS1)及びプレセニリン2(PS2)などの細胞内での分布を解析できることを確立し、このような構成成分の分布を測定することにより、 $\gamma$ -セクレターゼの活性に対して影響を与える物質をスクリーニングできることを明らかにした。

[0015] 本発明において、コレステロール合成阻害剤とは、生体内のコレステロールの合成を阻害することができる薬剤であり、生体内におけるコレステロールの生合成経路のいずれか1つの段階又は2以上の段階を阻害することができるものであればよい。本

発明のコレステロール合成阻害剤としては、例えば、HMG-CoA合成酵素阻害剤(Proc Natl Acad Sci USA.1987;84:7488-92)、HMG-CoA還元酵素阻害剤、スクアレンシシターゼ阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、ラノステロール合成酵素阻害剤、フィブラーート等のAMPK活性化剤(Biochemical Society Transactions.1997;25:S676)、及びビスホスホネート等のファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤(Biochem Biophys Res Commun 1999;264:108-111)などが挙げられる。好ましいコレステロール合成阻害剤としては、HMG-CoA還元酵素阻害剤が挙げられる。

また、本発明の蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤としては、生体内のゲラニルゲラニル化タンパク質の生成を阻害又は抑制することができる薬剤であればよく、生体内におけるゲラニルゲラニル化タンパク質の生合成経路のいずれか1の段階又は2以上の段階を阻害又は抑制することができるものであればよい。本発明の蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤としては、例えば、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、フィブラーート等のAMPK活性化剤、ビスホスホネート等のファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤、ゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤などが挙げられる。本発明の好ましい蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤としては、HMG-CoA還元酵素阻害剤、ゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤などが挙げられる。

したがって、本発明のコレステロール合成阻害剤、又は蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤としては、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、スクアレン合成酵素阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、ラノステロール合成酵素阻害剤、AMPK活性化剤、ファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤からなる群から選ばれた1種又は2種以上の薬剤を使用することができる。生体内におけるコレステロールの生合成経路とゲラニルゲラニルピロリン酸の生合成経路は、ファルネシルピロリン酸の合成経路までは同じであることから、ファルネシアピロリン酸の生合成までの経路における酵素活性阻害剤の使用が好ましい。例えば、本発明の好ましいコレステロール合成阻害剤又は蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤としては、HMG-CoA還元酵素阻害剤が挙げられる。より好ましい薬剤としてはスタチン類が挙げられる。これらの薬剤は、製剤学的に必要であれば、塩や溶媒

和物として使用することもできる。

[0016] 本発明における好ましいHMG-CoA還元酵素阻害剤としては、例えば、

ロバスタチン(化学名:(+)-(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-3, 7-ジメチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロ-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル (S)-2-メチルブチレート(米国特許第4, 231, 938号参照));

シンバスタチン(化学名:(+)-(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-3, 7-ジメチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロ-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル 2, 2-ジメチルブタノエート(米国特許第4, 444, 784号参照));

プラバスタチン(化学名:(+)-(3R, 5R)-3, 5-ジヒドロキシ-7-[(1S, 2S, 6S, 8S, 8aR)-6-ヒドロキシ-2-メチル-8-[(S)-2-メチルブチリルオキシ]-1, 2, 6, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-1-ナフチル]ヘプタン酸(米国特許第4, 346, 227号参照));

フルバスタチン(化学名:(3RS, 5SR, 6E)-7-[3-(4-フルオロフェニル)-1-(1-メチルエチル)-1H-インドール-2-イル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸(米国特許第5, 354, 772号参照));

アトルバスタチン(化学名:(3R, 5R)-7-[2-(4-フルオロフェニル)-5-イソプロピル-3-フェニル-4-フェニルカルバモイル-1H-ピロル-1-イル]-3, 5-ジヒドロキシヘプタン酸(米国特許第5, 273, 995号参照));

セリバスタチン(化学名:(3R, 5S)-エリスロ-(E)-7-[4-(4-フルオロフェニル)-2, 6-ジイソプロピル-5-メトキシメチル-ピリジン-3-イル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸(米国特許第5, 177, 080号参照));

メバスタチン(化学名:(+)-(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-7-メチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロ-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル (S)-2-メチルブチレート(米国特許第3, 983, 140号参照));

ロスバスタチン(化学名:7-[4-(4-フルオロフェニル)-6-イソプロピル-2-(N-メ

チル-N-メタンスルホニルアミノピリミジン)-5-イル]-(3R, 5S)-ジヒドロキシ-(E)-6-ヘプテン酸(米国特許第5, 260, 440号、日本国特許第2, 648, 897号参照))；

ピタバスタチン((3R, 5S, 6E)-7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-3-キノリル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸(米国特許第5, 856, 336号、日本国特許第2, 569, 746号参照))；

又はそれらの塩などが挙げられる。より好ましくは、ピタバスタチン、ロバスタチン、シンバスタチンなどが挙げられ、さらに好ましくは、ピタバスタチンが挙げられる。

[0017] 本発明における好ましいコレステロール合成阻害剤としては、HMG-CoA還元酵素阻害剤が挙げられ、当該HMG-CoA還元酵素阻害剤としては、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチン、アトルバスタチン、ピタバスタチン又はロスバスタチン、及びそれぞれの場合においてその薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる化合物が挙げられる。さらに好ましいHMG-CoA還元酵素阻害剤としては、ピタバスタチン又はその塩若しくはその溶媒和物が挙げられる。

[0018] 本発明は、 $\gamma$ -セクレターゼの活性を抑制すること、より詳細には脂質ラフトにおける活性を抑制することを、その目的のひとつとするものである。したがって、本発明の $\gamma$ -セクレターゼの活性抑制剤としては、 $\gamma$ -セクレターゼの複合体の形成を阻害することからなる $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤、又は $\gamma$ -セクレターゼ又はその活性複合体の脂質ラフトにおける分布を低下させるための $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の脂質ラフト分布低下剤のいずれのものであってもよい。

本発明の $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤、又は $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の脂質ラフト分布低下剤は、有効成分としてのコレステロール合成阻害剤及び/又は蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤、並びに製薬上許容される担体を含有することができ、これらの成分を含有してなる医薬組成物として使用することもできる。

また、本発明は、 $\gamma$ -セクレターゼの活性を抑制することが必要とされる患者に、本発明のコレステロール合成阻害剤、又は蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤の有効量を投与することからなる $\gamma$ -セクレターゼの活性化に伴う疾患を治療又は予防する方法を提供するものである。本発明の $\gamma$ -セクレターゼの活性を抑制することが必要とされ

る患者としては、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成によるA $\beta$ 40、A $\beta$ 42ペプチド、特にA $\beta$ 42の产生を抑制し、これらのペプチドの沈着に起因する各種の疾患、例えば、アルツハイマー病(AD)などが挙げられる。

[0019] 本発明のコレステロール合成阻害剤及び／又は蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤、又はこれらを含有してなる本発明の医薬組成物の投与経路としては、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与又は静脈内注射剤、筋肉内注射剤、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、点鼻剤等による非経口投与が挙げられる。

[0020] またこのような種々の剤型の医薬製剤を調製するには、この有効成分を単独で、又は他の薬学的に許容される賦形剤、結合剤、增量剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、嬌味剤、香料、被膜剤、担体、希釈剤等を1種又はそれ以上と適宜組み合わせて用いることができる。

[0021] 特に、HMG-CoA還元酵素阻害剤は、これらの投与経路のうち、経口投与が好ましい。経口投与用製剤の調製にあたっては、有効成分の安定性を考慮してpHを調整(特開平2-6406号、日本国特許第2,774,037号、WO97/23200号等参照)するのが好ましい。

[0022] これらの医薬の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状等によって異なるが、通常成人の場合、有効成分を一般式(1)で表される化合物として、一日0.01～1000mg、特に0.1～100mgを、1回又は数回に分けて経口投与又は非経口投与するのが好ましい。

[0023] 本発明の $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤又は $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の脂質ラフト分布低下剤は、脂質ラフトにおける $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する又は $\gamma$ -セクレターゼ若しくはその活性複合体の脂質ラフトにおける分布を低下させることにより、 $\gamma$ -セクレターゼの実質的な活性を抑制し、A $\beta$ 40、A $\beta$ 42ペプチド、特にA $\beta$ 42の产生を抑制し、これらのペプチドの沈着に起因する各種の疾患、例えば、アルツハイマー病(AD)などの予防や治療に有用である。

[0024] 本発明の $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法又は $\gamma$ -セクレターゼ若しくはその活性複合体の細胞内における分布を変化させる方法としては、培

養細胞や生体系などの被処理系に本発明のコレステロール合成阻害剤、及び／又は蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤を添加することによることにより行うことができる。本発明のこの方法は、特に脂質ラフト上における $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法又は $\gamma$ -セクレターゼ若しくはその活性複合体の脂質ラフトにおける分布を低下させる方法を提供するものである。

[0025] 本発明のコレステロールの合成阻害活性を測定する方法としては、コレステロールの合成量を測定できる方法であればよく、特に細胞中の脂質ラフトにおけるコレステロールの蓄積量を測定できる方法が好ましい。より具体的には、標識化又は非標識化されたコレステロール合成源を含有する培地中で、スクリーニング物質の存在下又は非存在下で細胞を培養し、所定時間後における細胞中、特に脂質ラフト中におけるコレステロールの含有量を測定することにより行うことができる。標識化としては、生合成に影響を与える、測定可能なものであれば特に制限はないが、通常は同位体による標識化が好ましい。このようにして、コントロールとの比較により、スクリーニング物質がコレステロール合成阻害活性を有するか否かを決定することができる。そして、本発明によれば、このようにしてスクリーニング物質のコレステロール合成阻害活性を測定することにより、当該スクリーニング物質が $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有するか否かをスクリーニングすることができる。

[0026] また、本発明は、被検物質の存在下に、細胞を培養し、細胞の脂質ラフトにおけるコレステロールの蓄積量を測定することからなる $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有する物質、又は $\gamma$ -セクレターゼの脂質ラフトにおける分布を低下させる作用を有する物質をスクリーニングする方法を提供するものである。この方法におけるコレステロールの蓄積量の測定法としては、標識化又は非標識化されたコレステロール合成源を含有する培地中で、スクリーニング物質(被検物質)の存在下又は非存在下で細胞を培養し、細胞中、特に脂質ラフト中におけるコレステロールの含有量を測定することにより行うことができる。このようにして、コントロールとの比較により、スクリーニング物質が $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有する物質であるか、又は $\gamma$ -セクレターゼの脂質ラフトにおける分布を低下させる作用を有する物質であるかを判定することができる。

[0027] また、本発明の $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定する方法、又は $\gamma$ -セクレターゼの脂質ラフトにおける分布を低下させる作用を測定する方法としては、例えば、スクリーニング物質の存在下、及び非存在下に細胞を培養し、培養された細胞の脂質ラフトを分離し、その中に含まれる $\gamma$ -セクレターゼの構成成分を測定する方法が挙げられる。脂質ラフトを分離する具体的方法としては、細胞膜分画を界面活性剤で処理する方法、蔗糖密度勾配法により分画する方法及びそれらの組み合わせが挙げられる。 $\gamma$ -セクレターゼの構成成分を測定する具体的方法としてはプレセニリン、ニカストリン、APH-1又はPen-2を免疫学的に測定する方法が挙げられる。

この方法により、スクリーニング物質が、コレステロール合成阻害剤、蛋白ゲラニルゲラニル化抑制剤、又はHMG-CoA還元酵素阻害剤としての作用を有しているか否かを判定することができる。

本発明のこれらにスクリーニング方法において使用される細胞としては、脂質ラフトが存在し、培養が容易なものであれば特に制限はないが、例えば、SH-SY5Y細胞(Invitrogen)などが好ましい。

[0028] 本発明の細胞の成分をフラクション化する方法としては、細胞をプロテアーゼなどを用いて消化して可溶化し、これを蔗糖(スクロース)、塩化セシウム、トリフルオロ酢酸セシウムなどを用いた密度勾配法などによりフラクション化することができる。このようなマクロドメインの生化学的分画法として、細胞を界面活性剤中でホモジネートとし、蔗糖密度勾配遠心法で界面活性剤不溶性画分を得る方法が知られているが、これに限定されるものではない。

脂質ラフトはプロテアーゼなどの消化によっては破壊されないので、脂質ラフトを特定のフラクションとして同定することが可能となり、脂質ラフトのフラクションと他のフラクションにおける $\gamma$ -セクレターゼ活性複合体の構成成分の検出、定量化をイムノブロッティング法などにより行うことができる。この場合に、脂質ラフトを同定するためのマーカーとして、フロチリン(flotillin)を用いることができるが、これに限定されるものではない。

本発明のこの方法により $\gamma$ -セクレターゼ活性複合体の各構成成分の細胞内での

、より正確には細胞膜における分布を測定することが可能となる。この分布により $\gamma$ -セクレターゼ活性複合体の形成を検出、定量化することも可能となり、当該細胞における $\gamma$ -セクレターゼの活性を測定することができる。

したがって、培養細胞に被検物質を添加して、被検物質を添加しない場合をコントロールとして、当該培養細胞における $\gamma$ -セクレターゼ活性複合体の構成成分の分布を前記した本発明の方法で測定することにより、被検物質の $\gamma$ -セクレターゼに対する作用、例えば、活性促進作用や活性阻害作用をスクリーニングすることができ、本発明は $\gamma$ -セクレターゼの活性をスクリーニングする新規な方法を提供する。

$\gamma$ -セクレターゼ活性複合体を形成するに必要とされる構成成分としては、ニカストリン(nicastrin)、APH-1、Pen-2、及び $\gamma$ -セクレターゼの活性サブユニットであるプレセニリン(presenilin)からなる群、好ましくはニカストリン(nicastrin)、APH-1、及びPen-2からなる群から選ばれる1種又は2種以上を採用することができる。

本発明のこれらにスクリーニング方法において使用される細胞としては、脂質ラフトが存在し、培養が容易なものであれば特に制限はないが、例えば、SH-SY5Y細胞(Invitrogen)などが好ましい。

#### [0029] 実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

#### [0030] 参考例1:細胞の培養

SH-SY5Y細胞(Invitrogen)は、完全培地(10%ウシ胎児血清(Sigma)、100 units/mLペニシリンおよび100 mg/mLストレプトマイシンを含むDMEM(Sigma))で37°Cで15cm径ディッシュに継代培養した。

#### [0031] 参考例2:界面活性剤不溶性膜ドメイン(detergent insoluble membrane domain (raft))の調製

SH-SY5Y細胞を15 cm径のディッシュに培養し、コンフレントになったものについてPBSで洗浄した。さらにセルスクレイパーを用いてPBS中に細胞を回収し、9807 m/s<sup>2</sup>で、5分間遠心した。沈殿した細胞を200  $\mu$ Lの2% CHAPSOとプロテアーゼ混合物(Complete protease mixture)(Roche)を含むバッファーR(buffer R) (20 mM

Tris-HCl pH 7.6、150 mM NaCl、1mM EDTA)に懸濁した。氷上に20分間静置することで可溶化を行った。可溶化後、800  $\mu$  Lの56.25% 蔗糖を含むバッファーR(buffer R)を加え、終濃度が45% 蔗糖、0.4% CHAPSOとなるように希釀し、遠心用チューブの底に添加した。さらにその上に3mLの35% 蔗糖を含むバッファーR(buffer R)を重ね、続けて1 mLの5% 蔗糖を含むバッファーR(buffer R)を重ねた。ベックマン超遠心器によりSW55ローターで980700 m/s<sup>2</sup> (32.000 rpm)で、4°Cで16時間遠心後、上部より500  $\mu$  Lずつ分取した。

#### [0032] 参考例3: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とイムノプロティング

前記の参考例2で分取した各画分についてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、イムノプロティングを行った。ニカストリンを認識する抗体としてニカストリン (N-19) (santa cruz)、プレセニリン1のC端側を認識する抗体として抗G1L3 (anti-G1L3)、プレセニリン2のC端側を認識する抗体として抗G2L (anti-G2L)、PEN-2を認識する抗体として抗PNT (anti-PNT3)、フロティリン-1を認識する抗体としてフロティリン-1 (Flotillin-1) (BD sciences)、カルネキシンを認識する抗体としてカルネキシン (BD biosciences)を用いた。

室温で1時間、または4°Cで終夜反応させた後、TBS-tween (20 mM Tris-buffered saline, pH7.4, 0.05% Tween 20) で2回洗浄を行った。つぎにHRP結合型抗マウスIgG抗体、または抗ヤギIgG抗体、または抗ウサギIgG抗体で1時間反応させ、TBS-tweenで洗浄した。さらにスーパーシグナルウエストドラ (Supersignal west dura) (pierce)で化学発光させ、X線フィルムに感光させた。

#### 実施例 1

#### [0033] メチル $\beta$ シクロデキストリンによる処理(図1、図2参照)

SH-SY5Y細胞を15 cm径のディッシュに培養し、コンフレントになったものについてPBSで洗浄後、メチル  $\beta$  シクロデキストリン(sigma)を最終濃度が0—2mMとなるように溶かしたDMEMを加え、37°Cでさらに30分間培養を行った。これらの細胞について前記した参考例2に記載の方法に準じて分画を行い、イムノプロティングを行った。

結果を図1に示す。また、コレステロール量及びタンパク質量を定量化した結果を図2にグラフ化して示す。図1及び図2における1—10の番号は細胞のフラクションを

示し、脂質ラフトはフラクション3である。

図1は、メチル  $\beta$  シクロデキストリン (M  $\beta$  CD) 処理後の細胞膜分画のイムノブロティングを示す。図1中の1–10のフラクションは、蔗糖密度勾配遠心法による細胞ホモジネートの分画の番号で、低比重のものが浮上し先の分画に出てきている。脂質ラフトのマーカーとしてウロチリン-1 (flotillin-1) が使用されている (図1E参照)。図1のAはニカストリンについてのものであり、Bは  $\gamma$ -セクレターゼの活性サブユニットのプレセニリン-1 (PS1) についてのものであり、Cはプレセニリン-2 (PS2) についてのものであり、DはPen-2についてのものであり、Eは脂質ラフトのマーカーとしてのフロチリン-1についてのものである。図1中のPS1及びPS2における「CTF」はCarboxy Terminal Fragment の意味で、PS1及びPS2のそれぞれのC末端部分を認識する抗体でイムノブロッティングを行ったことを示す。

各々のプロッティングの図は、上からメチル  $\beta$  シクロデキストリンの濃度が0mM、1mM、及び2mMのものである。

図2は、メチル  $\beta$  シクロデキストリンによる細胞膜分画のコレステロール及びタンパク質含量の変化を示したグラフである。

この結果、メチル  $\beta$  シクロデキストリンによりコレステロールが脂質ラフト (フラクション3) より除去され (図2の白抜き部分参照)、脂質ラフトのマーカータンパクであるフロティリンが本来の脂質ラフト分画であるフラクション3からフラクション9及び10に移行した (図1E参照)。同様に  $\gamma$ -セクレターゼの構成成分であるニカストリン、プレセニリン1、プレセニリン2及びPen-2が脂質ラフト分画 (フラクション3) から消失した (図1A、B、C及びD参照)。これによって、メチル  $\beta$  シクロデキストリンは脂質ラフトからコレステロールを引き抜くことによりラフト構造を破壊し、脂質ラフトにおける  $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害することが確認された。

## 実施例 2

[0034] HMG-CoA還元酵素阻害剤処理による処理 (図3、図4参照)

SH-SY5Y細胞を15 cm径のディッシュに培養し、コンフレントになる前の細胞について、PBSで洗浄した。DMEMに5% LPDS、250  $\mu$  Mのメバロン酸を加え、さらにコレステロールの生合成の阻害剤として50  $\mu$  Mのコンパクチンまたは5  $\mu$  Mのピタバスタチン

を加えた培地を調製し、48時間培養した。これらの細胞について前記した参考例2に記載の方法に準じて分画を行い、イムノプロティングを行った。

結果を図3に示す。また、コレステロール量及びタンパク質量を定量化した結果をグラフ化して図4に示す。図3及び図4における1-10の番号は細胞のフラクションを示し、脂質ラフトはフラクション3である。図3は、HMG-CoA還元酵素阻害剤処理後の細胞膜分画のイムノプロティングを示す。図3のAはニカストリンについてのものであり、BはPS1CTFについてのものであり、CはPS2CTFについてのものであり、Dはフロチリン-1についてのものである。各々のプロッティングの図は、上からコントロール、即ち、HMG-CoA還元酵素阻害剤を添加していない場合、中段はコンパクチンを50  $\mu$  M添加した場合、下段はピタバスタチンを5  $\mu$  M添加した場合をそれぞれ示す。図4は、HMG-CoA還元酵素阻害剤による細胞膜分画のコレステロール及びタンパク質含量の変化を示したグラフである。四角印(□及び■)はコントロールとしてのメバロン酸250  $\mu$  Mの場合を示し、丸印(○及び●)はコンパクチン(メバロン酸250  $\mu$  M及びコンパクチン50  $\mu$  M)の場合を示し、三角印(△及び▲)はピタバスタチン(メバロン酸250  $\mu$  M及びピタバスタチン5  $\mu$  M)の場合をそれぞれ示す。白抜きの印はコレステロールの量を示し、黒抜きの印はタンパク質の量を示す。

この結果、HMG-CoA還元酵素阻害剤であるコンパクチン及びピタバスタチンにより脂質ラフト(フラクション3)のコレステロールが減少し(図3参照)、実施例1と同様に $\gamma$ -セクレターゼの構成成分であるニカストリン、プレセニリン1及びプレセニリン2が脂質ラフト分画(フラクション3)から消失した(図3A、B及びC参照)。フロティリンは脂質ラフト分画に未だ残っておりラフト構造は保たれているが、コンパクチン及びピタバスタチンは脂質ラフトにおける $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害することが確認された。

### 産業上の利用可能性

[0035] 本発明は、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害し、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成による $\text{A}\beta 40$ 、 $\text{A}\beta 42$ ペプチド、特に $\text{A}\beta 42$ の産生を抑制し、これらのペプチドの沈着に起因する各種の疾患、例えば、アルツハイマー病(AD)などの治療や予防に有用な医薬組成物を提供するものであり、産業上の利用性を有する。

また、本発明は、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする方法や、 $\gamma$ -セクレターゼの脂質ラフトにおける分布を低下させる作用を有する物質をスクリーニングする方法を提供するものであり、有用な医薬品としての活性成分を簡便な手法で探索可能な方法を提供するものであり、産業上の利用性を有する。

## 請求の範囲

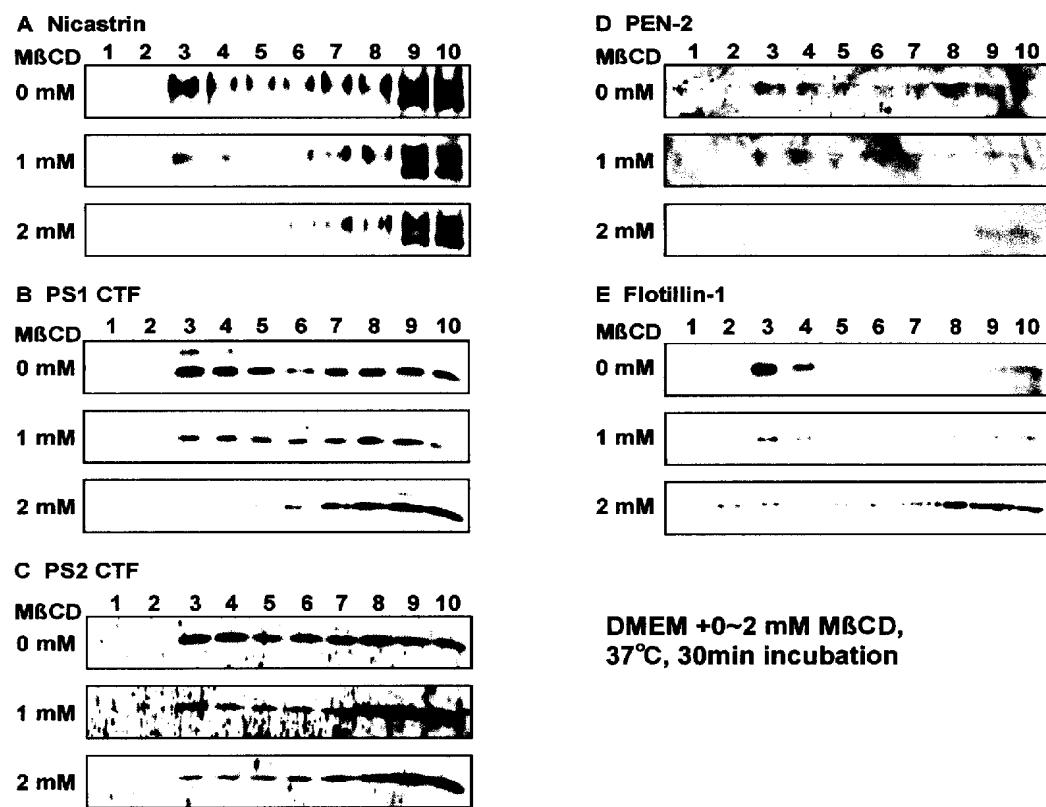
- [1] コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤を有効成分とする $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤。
- [2] コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤が、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、スクアレン合成酵素阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、ラノステロール合成酵素阻害剤、AMPK活性化剤、ファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤及びグラニルグラニル転移酵素阻害剤からなる群から選ばれた1種又は2種以上の薬剤である請求項1に記載の $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤。
- [3] コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤が、HMG-CoA還元酵素阻害剤である請求項1に記載の $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤。
- [4] コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤が、ピタバスタチンである請求項1に記載の $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤。
- [5] コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤を用いて、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法。
- [6] 脂質ラフト上における $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法である請求項5に記載の方法。
- [7] コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤が、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、スクアレン合成酵素阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、ラノステロール合成酵素阻害剤、AMPK活性化剤、ファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤、及び、グラニルグラニル転移酵素阻害剤からなる群から選ばれた1種又は2種以上の薬剤である請求項5に記載の $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法。
- [8] コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤が、HMG-CoA還元酵素阻害剤である請求項5に記載の $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法。
- [9] コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤が、ピタバスタチンである請求項5に記載の $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法。

- [10]  $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤を製造するためのコレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤の使用。
- [11]  $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤が、脂質ラフト上における $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害するものである請求項10に記載の使用。
- [12] コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤が、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、スクアレン合成酵素阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、ラノステロール合成酵素阻害剤、AMPK活性化剤、ファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤、グラニルグラニル転移酵素阻害剤からなる群から選ばれた1種又は2種以上の薬剤である請求項10に記載の使用。
- [13] コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤が、HMG-CoA還元酵素阻害剤である請求項10に記載の使用。
- [14] コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤が、ピタバスタチンである請求項10に記載の使用。
- [15] コレステロールの合成阻害活性を測定することからなる、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする方法。
- [16] コレステロールの合成阻害活性が、脂質ラフトに蓄積され得るコレステロールの合成阻害活性である請求項15に記載のスクリーニング方法。
- [17] コレステロールの合成阻害活性が、HMG-CoA合成酵素の阻害活性、HMG-CoA還元酵素の阻害活性、スクアレン合成酵素の阻害活性、スクアレンエポキシダーゼの阻害活性、ラノステロール合成酵素の阻害活性、AMPKの活性化、及びファルネシルピロリン酸合成酵素の阻害活性からなる群から選ばれたコレステロールの合成阻害活性である請求項15に記載のスクリーニング方法。
- [18] コレステロールの合成阻害活性が、HMG-CoA還元酵素の阻害活性である請求項15に記載のスクリーニング方法。
- [19]  $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定することからなるコレステロール合成阻害剤、蛋白グラニルグラニル化抑制剤又はHMG-CoA還元酵素阻害剤をスクリーニングする方法。
- [20]  $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定することからなる、H

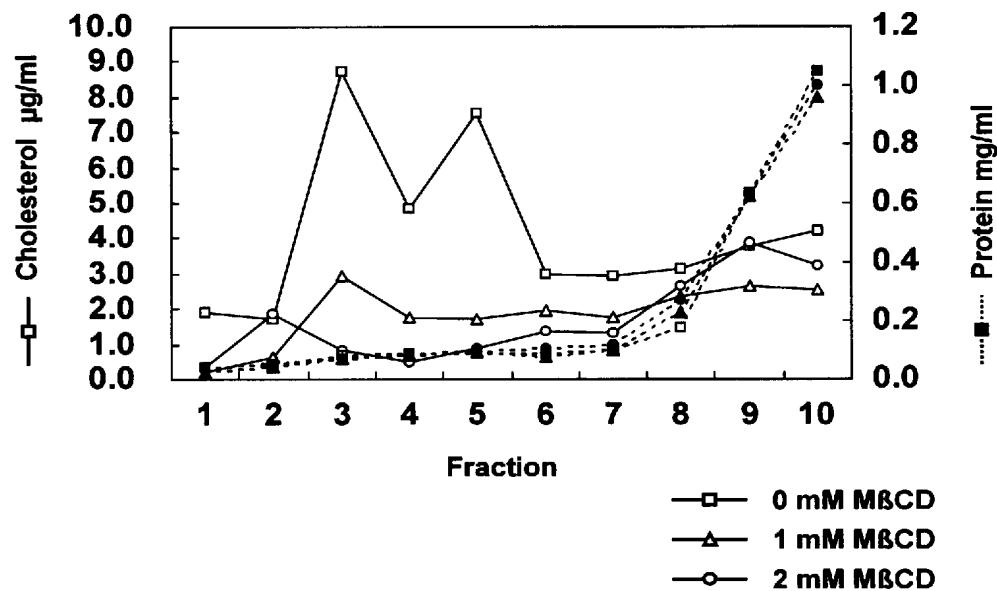
MG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、スクアレン合成酵素阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、ラノステロール合成酵素阻害剤、AMPK活性化剤、ファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤、グラニルグラニル転移酵素阻害剤からなる群から選ばれたコレステロール合成阻害剤をスクリーニングする方法。

- [21]  $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定することからなる、HMG-CoA還元酵素阻害剤をスクリーニングする方法。
- [22] 培養細胞に被検物質を添加して、細胞内における $\gamma$ -セクレターゼが、その活性複合体を形成するに必要とされる構成成分の細胞内における分布を測定することにより、被検物質の $\gamma$ -セクレターゼに対する作用をスクリーニングする方法
- [23]  $\gamma$ -セクレターゼ活性複合体を形成するに必要とされる構成成分が、ニカストリン、APH-1、及びPen-2からなる群から選ばれる1種又は2種以上である請求項22に記載の方法。

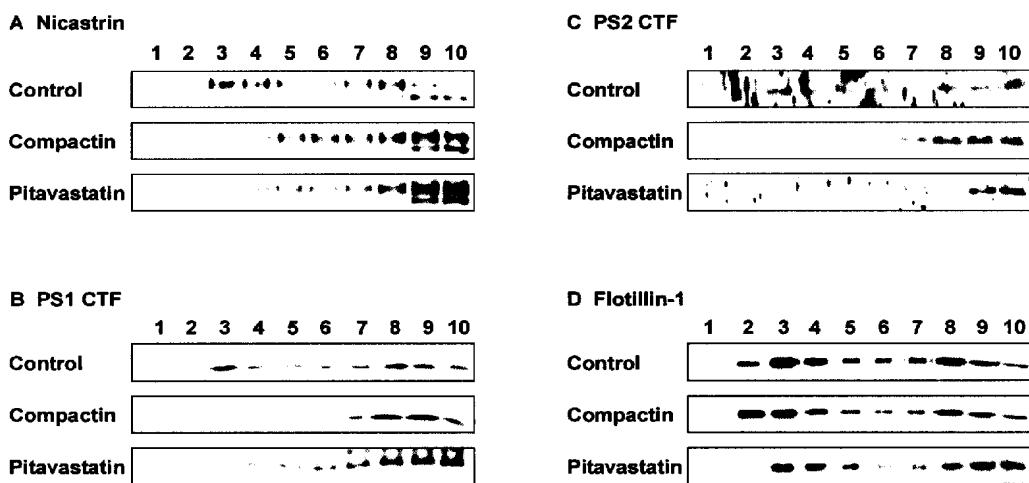
[図1]



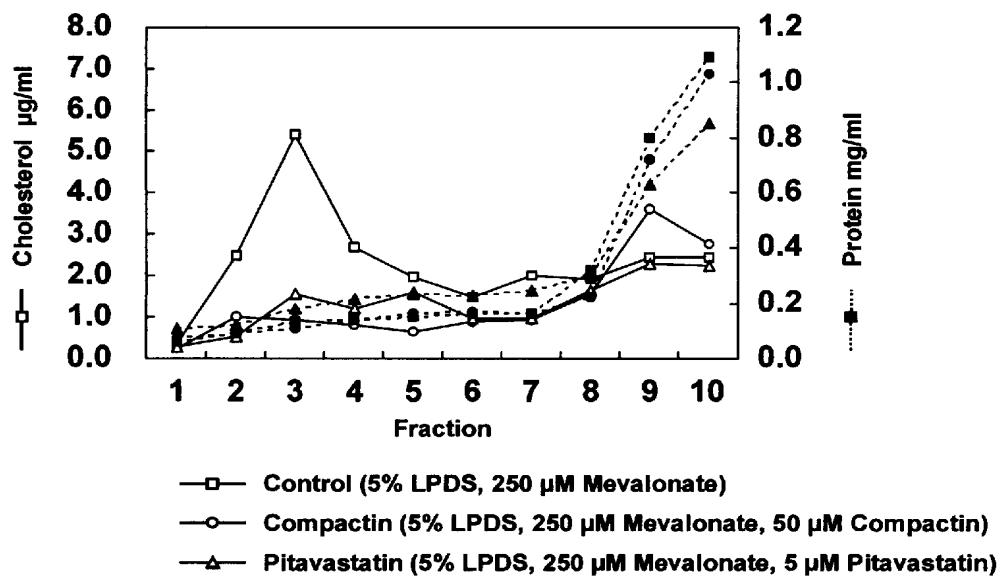
[図2]



[図3]



[図4]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/019628

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61P25/28, A61K43/00, A61K31/724, A61K31/35, A61K31/47, C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61P25/28, A61K43/00, A61K31/724, A61K31/35, A61K31/47, C12Q1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAP (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPIDS (STN), JOIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Takufumi YAMASHITA et al., 'Chiho to Kekkan Bychen Statin to Chiho', Bunshi Nokekkanbyo, (01 October, 2004 (01.10.04)), Vol.3, No.4, pages 415 to 425, full text	1-4, 10-23
X	WO 02/62824 A2 (ANDRX CORP.), 15 August, 2002 (15.08.02), Full text; Claims; examples & US 2002/107173 A1 & EP 1366061 A2	1-4, 10-14
X	SIMONS, M. et al., 'CHOLESTEROL DEPLETION INHIBITS THE GENERATION OF BETA-AMYLOID IN HIPPOCAMPAL NEURONS.', PROC.NATL.ACAD.SCI. USA., (1998), Vol.95, No.11, pages 6460 to 6464, full text	1-4, 10-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 April, 2005 (18.04.05)

Date of mailing of the international search report  
10 May, 2005 (10.05.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019628

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOJRO, E. et al., 'LOW CHOLESTEROL STIMULATES THE NONAMYLOIDOGENIC PATHWAY BY ITS EFFECT ON THE ALPHA-SECRETASE ADAM 10.', PROC.NATL.ACAD. SCI.USA., (2001), Vol.98, No.10, pages 5815 to 5820, full text	1-4,10-14
X	WOLOZIN, B., 'CHOLESTEROL AND ALZHEIMER'S DISEASE.', BIOCHEM.SOC.TRANS., (2002), Vol.30, No.4, pages 525 to 529	1-4,10-14
X	WAHRLE, S. et al., 'CHOLESTEROL-DEPENDENT GAMMA-SECRETASE ACTIVITY IN BUOYANT CHOLESTEROL-RICH MEMBRANE MICRODOMAINS.', NEUROBIOL.DIS., (2002), Vol.9, No.1, pages 11 to 23, full text	15-23
A	WADA, S. et al., 'GAMMA-SECRETASE ACTIVITY IS PRESENT IN RAFTS BUT IS NOT CHOLESTEROL-DEPENDENT.', BIOCHEMISTRY, (02 December, 2003 (02.12.03)), Vol.43, No.47, pages 13977 to 13986, full text	1-4,10-23
A	Tsuneo YAMAZAKI, 'Statin wa Amyloid $\beta$ Tanpaku ( $A\beta$ ) no Saibonai Torikomi o Sokushin suru', Clinical Neurology, (2002), Vol.42, No.12, page 1309, P3-F-17	1-4,10-23

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/019628

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 5-9

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 5 to 9 involve embodiments concerning methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT (continued to extra sheet)

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2004/019628

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

Claims 1 and 10 relate to an inhibitor for the formation of a  $\gamma$ -secretase complex which comprises, as the active ingredient, a compound defined by a desired inhibitory or regulatory effect such as "a cholesterol synthesis inhibitor or a protein geranylgeranylation regulator". Although these claims involve any compounds having the corresponding property, it is recognized that only small part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scopes of compounds having the property as "a cholesterol synthesis inhibitor or a protein geranylgeranylation regulator" cannot be definitely specified. Thus, these claims do not comply with the requirement of clearness under PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made mainly on the relationship between the effect of inhibiting cholesterol synthesis or the effect of regulating protein geranylgeranylation and the formation a  $\gamma$ -secretase complex, and an inhibitor for the formation of a  $\gamma$ -secretase complex, an inhibitor for the formation of an amyloid protein or a preventive/remedy for Alzheimer's disease comprising, as the active ingredient, the following compounds which are particularly employed in EXAMPLES in the description and disclosed therein with certain data relating to the effect of "inhibiting the formation of a  $\gamma$ -secretase complex":

methyl- $\beta$ -cyclodextrin; or  
HMG-CoA reductase inhibitors including compactin and pitavastatin.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.<sup>7</sup>

A61K45/00, A61P25/28, A61K43/00, A61K31/724, A61K31/35, A61K31/47, C12Q1/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.<sup>7</sup>

A61K45/00, A61P25/28, A61K43/00, A61K31/724, A61K31/35, A61K31/47, C12Q1/00

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAP(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), WPIDS(STN), JOIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	山下拓史他 「痴呆と血管病変、スタチンと痴呆」 分子脳血管病, (2004.10.01) VOL.3 NO.4 P.415-425 文献全体	1-4, 10-23
X	WO 02/62824 A2 (ANDRX CORPORATION) 2002.08.15 文献全体、 CLAIMS、 EXAMPLES & US 2002/107173 A1 & EP 1366061 A2	1-4, 10-14

□ C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

18.04.2005

## 国際調査報告の発送日

10.05.2005

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官（権限のある職員）

4C 8828

大久保 元浩

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SIMONS,M. ET AL. 'CHOLESTEROL DEPLETION INHIBITS THE GENERATION OF BETA-AMYLOID IN HIPPOCAMPAL NEURONS.' PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, (1998) VOL.95 NO.11 P.6460-6464 文献全体	1-4, 10-14
X	KOJRO,E. ET AL. 'LOW CHOLESTEROL STIMULATES THE NONAMYLOIDOGENIC PATHWAY BY ITS EFFECT ON THE ALPHA-SECRETASE ADAM 10.' PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, (2001) VOL.98 NO.10 P.5815-5820 文献全体	1-4, 10-14
X	WOLOZIN,B. 'CHOLESTEROL AND ALZHEIMER'S DISEASE.' BIOCHEM.SOC.TRANS., (2002) VOL.30 NO.4 P.525-529	1-4, 10-14
X	WAHRLE,S. ET AL. 'CHOLESTEROL-DEPENDENT GAMMA-SECRETASE ACTIVITY IN BUOYANT CHOLESTEROL-RICH MEMBRANE MICRODOMAINS.' NEUROBIOL. DIS., (2002) VOL.9 NO.1 P.11-23 文献全体	15-23
A	WADA,S. ET AL. 'GAMMA-SECRETASE ACTIVITY IS PRESENT IN RAFTS BUT IS NOT CHOLESTEROL-DEPENDENT.' BIOCHEMISTRY, (2003.12.02) VOL.43 NO.47 P.13977-13986 文献全体	1-4, 10-23
A	山崎恒夫 'スタチンはアミロイド $\beta$ 蛋白 (A $\beta$ ) の細胞内取込みを促進する' 臨床神経学, (2002) VOL.42 NO.12 P.1309 P3-F-17	1-4, 10-23

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 5-9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 5-9 は、治療による人体の処置方法に係る態様を含むものであって、PCT第17条(2)(a)(i) 及び PCT規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。

請求の範囲 1、10は、「コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤」なる、所望の阻害・抑制作用により定義された化合物を有効成分とする $\gamma$ -セレクターゼ複合体形成阻害剤に関するものである。そして、各請求の範囲は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT 6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT 5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分に過ぎないものと認められる。

また、「コレステロール合成阻害剤、又は蛋白グラニルグラニル化抑制剤」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の明確な範囲を特定できないから、各請求の範囲は、PCT 6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、コレステロール合成阻害作用もしくは蛋白グラニルグラニル化抑制作用と、 $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成との関係について主に行つた他、明細書の実施例で具体的に採用され、「 $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害」作用について一応のデータ結果を以て開示されている、

- ・ メチル- $\beta$ -シクロデキストリン

もしくは

- ・ コンパクチン及びピタバスタチンを含むHMG-C<sub>0</sub>A還元酵素阻害剤

を有効成分とする、 $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤、アミロイド蛋白形成阻害剤もしくはアルツハイマー病の予防・治療剤、について、主に行つた。